

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой

\_\_\_\_\_

подпись	инициалы, фамилия
« ____ » _____	20 ____ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология  
код – наименование направления

Использование метода HRM для анализа соматических мутаций при  
гемобластозах

тема

Руководитель	_____	<u>доцент, канд. биол. наук</u>	Т.Н. Субботина
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Выпускник	_____	Д.В. Курочкин
	подпись, дата	

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Использование метода HRM для анализа соматических мутаций при гемобластозах» содержит 50 страниц текстового документа, 18 иллюстраций, 4 таблицы и 61 использованный источник.

**ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, PH-НЕГАТИВНЫЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ, HIGH RESOLUTION MELT, МУТАЦИИ ГЕНА FLT3, МУТАЦИИ ГЕНА CALR.**

Целью данной работы является скрининг соматических мутаций в генах FLT3 и CALR методом HRM-анализа при использовании амплификатора «CFX96» и программы «Precision Melt Analysis» (Bio-Rad, США) для пациентов с диагнозом ОМЛ и Ph-МПН.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать тест-системы для выявления соматических мутаций в генах FLT3 и CALR на основе HRM-анализа.
2. Апробировать разработанные тест-системы на образцах ДНК от пациентов с диагнозом ОМЛ и Ph-МПН.
3. Сравнить полученные результаты с данными, полученными при использовании других молекулярно-генетических технологий.

Ассоциированные с лейкозами соматические мутации очень разнообразны, встречаются с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки. Поэтому на начальном этапе выполнения молекулярно-генетических диагностических процедур по выявлению мутаций желательно иметь возможность проведения в лаборатории скрининговых методов.

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что включение HRM-анализа в качестве скринингового теста в алгоритм лабораторного тестирования позволяет повысить эффективность и доступность молекулярно-генетических технологий диагностики ОМЛ и Ph-МПН.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ .....	6
1.1 Лейкозы .....	6
1.2 Острый миелоидный лейкоз.....	7
1.2.1 Генетическая основа развития острого миелоидного лейкоза .....	8
1.2.2 Мутации гена FLT3 .....	10
1.2.3 Стратификация ОМЛ по группам прогноза .....	12
1.3 Миелопролиферативные неоплазмы .....	15
1.3.1 Строение сигнального пути JAK/STAT .....	15
1.3.2 Мутации генов сигнальных путей.....	18
1.3.3 Соматические мутации в гене кальретикулина (CALR) .....	20
1.4 Методы выявления мутаций в гене FLT3 .....	22
1.5 Методы выявления мутаций в гене CALR.....	23
1.6 High Resolution Melt .....	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1 Объект исследования .....	28
2.2 Выделение ДНК из клинического материала с использованием реагента «ДНК-сорб-В» .....	28
2.3 Измерение концентрации ДНК .....	30
2.4 Проведение ПЦР-HRM с использованием комплекта реагентов Precision Melt Supermix (Bio-Rad, США).....	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	35
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	36
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	37

## ВВЕДЕНИЕ

Лейкозы представляют собой широкую группу гемопоэтических злокачественных новообразований. В норме в костном мозге располагаются стволовые клетки крови, которые обладают способностью к дифференцировке и выполнению специализированных функций в организме. Из этих стволовых клеток развиваются все разновидности форменных элементов крови. При лейкозах кровяные клетки способны размножаться на более поздних стадиях гемопоеза, чем в норме, что приводит к замещению нормальных клеток костного мозга опухолевыми клетками.

Весь комплекс кроветворения можно разделить на два направления (ростка): лимфопоэз (образование лимфоцитов) и миелопоэз (образование остальных типов клеток крови). В зависимости от того, какой росток кроветворения поражен, лейкозы делятся на лимфоидные (лимфобластные) и миелоидные (миелобластные). По клиническому течению лейкозы делятся на острые и хронические [1,2].

Ассоциированные с лейкозами соматические мутации очень разнообразны, встречаются с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки. Поэтому на начальном этапе выполнения молекулярно-генетических диагностических процедур по выявлению мутаций желательно иметь возможность проведения в лаборатории скрининговых методов. Это особенно важно, когда проводится анализ редких и разнообразных мутаций, например, мутаций в гене FLT3 и CALR.

HRM-анализ позиционируется как быстрый, надежный и высокочувствительный метод для скрининга как однонуклеотидных замен, так и инсерций и делеций. Кроме того, он не требует больших временных затрат.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы является скрининг соматических мутаций в генах FLT3 и CALR методом HRM-анализа при использовании амплификатора «CFX96» и программы «Precision Melt Analysis» (Bio-Rad, США) для пациентов с диагнозом ОМЛ и Ph-МПН.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

4. Разработать тест-системы для выявления соматических мутаций в генах FLT3 и CALR на основе HRM-анализа.

5. Апробировать разработанные тест-системы на образцах ДНК от пациентов с диагнозом ОМЛ и Ph-МПН и ранее выявленными мутациями в генах FLT3 и CALR соответственно.

6. Сравнить полученные результаты с данными, полученными при использовании других молекулярно-генетических технологий.

# **1 ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

## **1.1 Лейкозы**

Лейкозы представляют собой широкую группу гемопозитических злокачественных новообразований. В норме в костном мозге располагаются стволовые клетки крови, которые обладают способностью к дифференцировке и выполнению специализированных функций в организме. Из этих стволовых клеток развиваются все разновидности форменных элементов крови. При лейкозах кровяные клетки способны размножаться на более поздних стадиях гемопоза, чем в норме.

По способности к дифференциации клеток крови выделяют: острые и хронические лейкозы.

Характерной чертой острого лейкоза (ОЛ) является развитие из недифференцированных или малодифференцированных клеток, а также быстрое прогрессирование, при котором количество патологических клеток нарастает довольно быстро. При исследованиях костного мозга обнаруживают высокое содержание бластных клеток, по сравнению с нормальными – зрелыми клетками крови, выполняющими специализированные функции в организме. Кроме того, при ОЛ наблюдается «лейкемический провал» – отсутствие промежуточных форм между бластами и зрелыми клетками.

Хронические лейкозы (ХЛ) представляют собой группу злокачественных заболеваний системы крови, для которых характерен дефект (мутация) на уровне полипотентной стволовой клетки. При ХЛ опухолевый клон представлен морфологически зрелыми и созревающими клетками. Количество патологических клеток нарастает небыстро, кроме того, они частично или даже полностью выполняют специализированные функции.

В соответствии с классификацией экспертов Всемирной организации здравоохранения (2008, модификация в апреле 2016 г.), все опухоли из клеток гемопозитической ткани (гемобластозы) делятся на лимфоидные и миелоидные [1, 2].

Миелоидные лейкозы характеризуются увеличением продукции клеток миелоидного ряда (гранулоцитов, моноцитов, эритрокариоцитов, мегакариоцитов), принадлежащих к опухолевому клону.

Лимфоидные лейкозы характеризуются увеличением продукции клеток лимфоидного ряда (Т- и В-лимфоцитов), принадлежащих к опухолевому клону.

## **1.2 Острый миелоидный лейкоз**

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенное заболевание, характеризующееся клональной экспансией миелоидных предшественников (бластов) в костном мозге и периферической крови. Одним из основных критериев обнаружения при проведении дифференциального диагноза между ОМЛ и другими злокачественными заболеваниями кроветворной ткани является обнаружение более 20 % бластов в костном мозге.

ОМЛ составляет от 15 до 20% случаев острого лейкоза у детей и 80% у взрослых. ОМЛ является преобладающей формой лейкоза в неонатальном и взрослом периоде, но составляет небольшую часть случаев в младенческом и подростковом возрасте. Небольшое увеличение встречаемости ОМЛ происходит в первый год жизни – примерно 1,5 случая на 100 000. В первые 10 лет жизни заболеваемость снижается до 0,4 новых случаев на 100 000 человек, но во втором десятилетии жизни вновь возрастает до 1 случая на 100 000 человек. Приблизительно с 25 лет заболеваемость увеличивается в геометрической прогрессии до 25 случаев на 100 000 человек. В целом заболеваемость ОМЛ составляет 3,6 на 100 тыс. населения.

В течение многих лет классификация ОМЛ основывалась исключительно на цитологическом исследовании костного мозга и периферической крови [3]. Однако гетерогенность в молекулярных механизмах этого заболевания проявляется морфологической изменчивостью клеток и степенью их дифференцировки. Это послужило основой для создания определенных подгрупп ОМЛ.

По классификации ВОЗ 2008 г. выделяют 4 подгруппы ОМЛ [4]:

- 1) ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями (транслокациями, делециями, инверсиями);
- 2) ОМЛ с многолинейной дисплазией;
- 3) Вторичные лейкозы, вызванные применением противоопухолевых цитостатических препаратов;
- 4) Другие формы ОМЛ, которые не попадают ни в одну из выше представленных групп.

### **1.2.1 Генетическая основа развития острого миелоидного лейкоза**

ОМЛ характеризуется высокой степенью гетерогенности в отношении хромосомных аномалий и мутаций генов [5]. На основе разновидностей генетических дефектов выделяют 2 основные группы ОМЛ.

К первой группе относят пациентов с различными хромосомными aberrациями, приводящими к изменению кариотипа. Наиболее распространенными хромосомными aberrациями являются реципрокные транслокации, в результате которых происходит образование химерных генов [6]. Образование химерного гена приводит к экспрессии химерного белка, который способен стимулировать бесконтрольную клеточную пролиферацию и блокировать дифференцировку миелоидных клеток.

Хромосомная транслокация  $t(8;21)(q22;q22)$  является одной из основных рецидивирующих хромосомных транслокаций, ее обнаружение позволяет диагностировать ОМЛ независимо от количества бластных клеток в периферической крови или костном мозге. Данная транслокация встречается у 5-10% пациентов с ОМЛ, преимущественно – у молодых людей до 30 лет и редко у младенцев [7]. В большинстве случаев транслокация  $t(8;21)(q22;q22)$  является единственным хромосомным изменением у пациентов, но  $t(8;21)$  также может встречаться с дополнительными численными или структурными аномалиями (например потеря хромосомы X или Y,  $del(9q)$ , +8,  $del(7q)$ , -7).  $T(8; 21)(q22; q22)$



характеризуется тем, что область гена RUNX1 (AML1 или CBFA), расположенная на 21q22, и область гена RUNX1T1 (ETO, MTG8 или CBFA2T1), расположенная на 8q22, образуют гибридный ген RUNX1 / RUNX1T1 [8]. RUNX1 кодирует транскрипционный регуляторный фактор CBF $\alpha$ , который в комплексе с CBF $\beta$  активирует транскрипцию генов, контролирующих миелоидную дифференцировку. В конечном итоге транслокация t(8;21)(q22;q22) приводит к образованию химерного белка CBF $\alpha$ -ETO, что в свою очередь ингибирует транскрипцию факторов дифференцировки миелоидных клеток.

Транслокация t(15; 17)(q24; q21) обнаруживается примерно в 95% острого промиелоцитарного лейкоза (специфического подтипа ОМЛ). Транслокация t(15;17) приводит к слиянию гена PML расположенного на 15q24 и гена RARA расположенного на 17q21 с образованием химерного гена PML-RAR $\alpha$ . Транслокация t(15;17) приводит к экспрессии гена PML-RAR $\alpha$  в гемопозитических миелоидных клетках [9]. Химерный белок PML-RAR $\alpha$  действует как репрессор транскрипции генов, участвующих дифференцировке и апоптозе миелоидных клеток.

Inv(16)(p13.1q22) обнаруживается примерно в 5-8 % случаев ОМЛ. Встречается во всех возрастных группах, но преимущественно у молодых пациентов. В результате inv (16) происходит слияние генов CBFB / MYH11. Это слияние нарушает нормальную функцию ключевого белкового комплекса (CBFB), который участвует в регуляции гематопоеза млекопитающих и развитии костей, что в конечном итоге приводит к нарушению созревания гематопозитических клеток.

Перестройки гена MLL (KMT2A), расположенного на 11q23, составляют примерно 5% случаев ОМЛ и наблюдаются преимущественно у людей среднего возраста. Перестройки гена MLL представляют собой различные транслокации, которые приводят к образованию химерных генов [10]. На сегодняшний день известно более 70 генов, образующих с геном MLL химерные продукты: t(9;11)(p22;q23) (MLLT3), t(10;11)(p12;q23) (MLLT10), t(11;19)(q23;p13.1) (MLLT1), t(11;19)(q23;p13.3) (ELL), t(11;17)(q23;q21) (MLLT6), t(1;11)(q21; q23)

(MLLT11), t(X;11) (q24;q23) (SEPT6) и т.д. Хромосомные перестройки с участием гена MLL в большинстве случаев определяют плохой прогноз и поэтому имеют большое клиническое значение.

Ко 2 группе относятся пациенты без цитогенетических отклонений. Такие лейкозы называются цитогенетически-нормальными острыми миелоидными лейкозами (ЦН-ОМЛ). У пациентов с ЦН-ОМЛ был выявлен целый спектр патогенных мутаций, представляющих собой по большей части дупликации небольших генных фрагментов и точечные мутации. Наиболее значимыми для определения прогноза и стратегии лечения ОМЛ являются мутации в генах: FLT3, MLL, CEBPA, RUNX1 (AML1), NPM [11-13].

### 1.2.2 Мутации гена FLT3

Ген FLT3 расположен на хромосоме 13q12 и включает 24 экзона. Данный ген кодирует мембрано-связанную рецепторную тирозинкиназу (RTK), которая принадлежит к семейству рецепторных тирозинкиназ класса 3 [14]. Рецептор FLT3 состоит из внеклеточного лиганд-связывающего домена (Ig-like domain), состоящего из пяти иммуноглобулиноподобных доменов, трансмембранного домена (TM), юкта-мембранного домена (JM) и внутриклеточного киназного домена (TKD1; TKD2), разделенного на две части с помощью киназной вставки (KI). Строение рецептора FLT 3 представлено на рисунке 1.

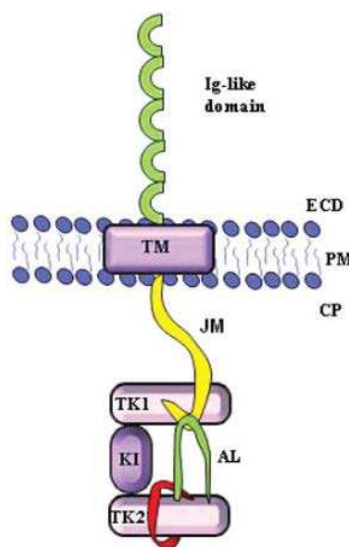


Рисунок 1 – Строение рецептора FLT3 [14].

Лиганд для FLT3 (лиганд FLT3 или FL) был клонирован в 1993 году. FL экспрессируется в клетках микроокружения костного мозга, включая фибробласты костного мозга, а также в миелоидном ростке кроветворения. FL приводит к димеризации рецептора и его аутофосфорилированию, запуская сигнальные пути, ответственные за пролиферацию клеток. На это взаимодействие влияют и другие цитокины, такие как лиганд Kit (KL). Показано, что при стимуляции *in vitro* клеток-предшественников либо только FL, или либо только KL, достигается незначительный или нулевой пролиферативный ответ, но оба лиганда вместе синергически усиливают рост. Схема активации FLT3 представлена на рисунке 2.

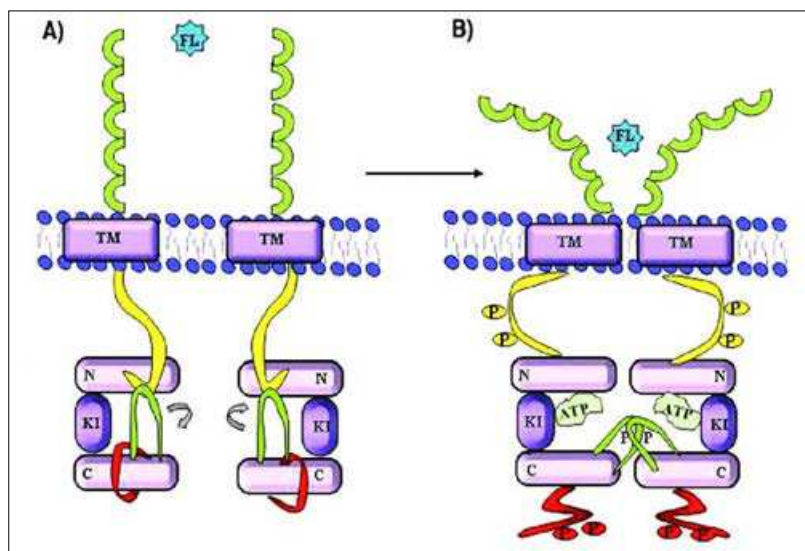


Рисунок 2 – Механизм активации рецептора FLT3 [16]:

А – неактивная форма, В – активная форма

Два киназных домена (TKD1 и TKD2) формируют активный центр фермента, в основе которого лежит петля активации (А-петля). В неактивной форме JM домен принимает такую конформацию, которая блокирует А-петлю, что приводит к ингибированию самодимеризации. При связывании лиганда происходит преодоление ингибирующего эффекта, за счет аутофосфорилирования тирозинкиназы в JM и, как следствия, изменения его конформации. Активная форма тирозинкиназы фосфорилирует нижестоящие элементы сигнальных путей, запуская каскад реакций, ведущих к пролиферации и активации клеток. Такими путями являются MAP-киназный и АКТ пути.

Также упоминается STAT путь, однако есть упоминание о патологичности данного пути для FLT3.

FLT3 экспрессируется на миелоидных и лимфоидных клетках-предшественниках, и по мере дифференцировки кроветворных клеток экспрессия снижается. FLT3 играет важную роль в пролиферации, дифференцировке и выживании мультипотентных стволовых клеток. FLT3 экспрессируется в 90% лейкозных бластов у пациентов с ОМЛ [15,16]. Мутации в гене FLT3 являются одними из наиболее частых соматических изменений и встречаются у 25–45% пациентов с ОМЛ. Клинические рекомендации ВОЗ 2017 года включают наличие FLT3 мутаций в диагностические критерии диагностики ОМЛ. Мутации FLT3 представлены двумя основными типами. Наиболее распространенным типом является tandemная дупликация нуклеотидов (ITD) в экзонах 14 и 15 (ранее известные как экзоны 11 и 12). ITD-FLT3 встречается у 25–35% взрослых и 12% детей с ОМЛ [17]. Длина дублированной области варьируется от 3 до 1236 нуклеотидов, но несмотря на эту гетерогенность, ITD всегда находится в пределах рамки считывания [18].

Мутации в домене TKD являются вторым наиболее распространенным типом мутаций FLT3 при ОМЛ (встречается у 14% взрослых пациентов с ОМЛ) [19]. Мутации в TKD в основном представляют собой точечные мутации, приводящие к замене аминокислот в петле активации TKD2 (D835, I836 и Y842) и TKD1 (N676 и F691). Другие точечные мутации также были идентифицированы в TKD и других доменах (например в Ig-like и JM домене). Данные мутации встречаются у 2% пациентов с ОМЛ. Прогностическая значимость мутаций FLT3-TKD в общей популяции ОМЛ и влияние аллельного соотношения FLT3-TKD все еще остаются спорными и могут зависеть от дополнительных мутаций, а также от цитогенетического фона [20].

### **1.2.3 Стратификация ОМЛ по группам прогноза**

Использование молекулярных маркеров в качестве прогностических факторов позволяет разделить пациентов с ОМЛ на 3 клинические группы

прогноза: благоприятная, промежуточная и неблагоприятная. Молекулярно-генетическая классификация ОМЛ представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Молекулярно-генетическая классификация ОМЛ 2017 г.

Группа риска	Генетические аномалии
Благоприятная	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>NPM1</i>«+»/<i>FLT3</i>-ITD«-» или <i>FLT3</i>-ITD«+» (низк)</li> <li>• Биаллельная мутация <i>CEBPA</i></li> <li>• <i>t</i>(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>• <i>inv</i>(16)(p13.1;q22) or <i>t</i>(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></li> </ul>
Промежуточная	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>NPM1</i>«+»/<i>FLT3</i>-ITD«+» (выс)</li> <li>• <i>NPM1</i>«-»/<i>FLT3</i>-ITD«-»или <i>FLT3</i>-ITD«+» (низк) в отсутствии неблагоприятных генетических аномалий</li> <li>• <i>t</i>(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> (ранее <i>MLLT3-MLL</i>)</li> <li>• Цитогенетические аномалии, не классифицированные как благоприятные или неблагоприятные</li> </ul>
Неблагоприятная	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Комплексный кариотип</li> <li>• Моносомный кариотип</li> <li>• -5или <i>del</i>(5q); -7; -17/<i>abn</i>(17p)</li> <li>• <i>T</i>(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> (перегруппированный аллельный сегмент)</li> <li>• <i>inv</i>(3)(q21;q26.2) или <i>t</i>(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i></li> <li>• <i>t</i>(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></li> <li>• <i>T</i>(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></li> <li>• <i>NPM1</i>«-»/<i>FLT3</i>-ITD«+» (выс)</li> <li>• Мутация <i>TP53</i></li> <li>• Мутация <i>RUNX1</i> (не является неблагоприятной при подтипе ОМЛ из группы благоприятного риска)</li> <li>• Мутация <i>ASXL1</i> (не является неблагоприятной при подтипе ОМЛ из группы благоприятного риска)</li> </ul>

Группа пациентов с благоприятным прогнозом характеризуется 90% частотой полных ремиссий (ПР) и 55–85% частотой 5-летней выживаемости [21]. Так, пациенты с транслокацией *t*(8;21)(q22;q22) и инверсией *inv*(16)(p13.1;q22) относятся к группе благоприятного прогноза [22]. Присутствие у пациентов благоприятной группы прогноза нескольких хромосомных aberrаций не ухудшает прогноз течения заболевания, а даже может увеличить вероятность успешного лечения, как, например, в случае одновременного присутствия *inv*(16)(p13.1;q22) и трисомии 22 хромосомы.

Пациенты группы неблагоприятного прогноза характеризуются 60% частотой ПР и 20% частотой пятилетней выживаемости [23]. К группе неблагоприятного прогноза относятся пациенты с хромосомными aberrациями:

t(6;9)(p23;q34.1); t(v;11q23.3); t(9;22)(q34.1;q11.2); inv(3)(q21.3q26.2). Часто у неблагоприятной группы прогноза встречаются дополнительные хромосомные аномалии: -5 или del(5q); -7; аберрации (17p). Также к неблагоприятной группе ОМЛ относят пациентов с комплексным кариотипом. На данный момент комплексным кариотип при ОМЛ принято называть наличие у пациента более 3 хромосомных аберраций [23]. Кроме того, к группе неблагоприятного прогноза относят пациентов с моносомным кариотипом. Под моносомным кариотипом при ОМЛ понимают наличие у пациента 2 аутосомных моносомий или одновременное присутствие аутосомной моносомии с любой транслокацией или инверсией, кроме t(8;21)(q22;q22) и inv(16)(p13.1;q22) [24].

У пациентов с ОМЛ был выявлен целый спектр прогностически значимых мутаций в различных генах. На сегодняшний день 90 % случаев ОМЛ можно определить к различным клиническим группам прогноза, в зависимости от выявленных мутаций, в особенности диагностика данных мутаций важна для пациентов с нормальным кариотипом. На данный момент мутации в генах NPM1, FLT3, а также в гене СЕВРА, являются наиболее изученными молекулярно-генетическими маркерами ЦН-ОМЛ с установленной прогностической значимостью [22].

Пациенты с мутациями в генах NPM1 и СЕВРА (биаллельной) в отсутствие мутаций FLT3-ITD относятся к группе с благоприятным прогнозом. Наличие мутации FLT3-ITD значительно снижает показатели безрецидивной и общей выживаемости пациентов с ОМЛ. На прогноз заболевания влияет не только наличие мутации FLT3-ITD, но и уровень аллельной нагрузки мутации. Так, пациенты с высоким уровнем аллельной нагрузки мутации относятся к группе с неблагоприятным прогнозом. Следует отметить, что на клиническое течение ОМЛ влияют определенные комбинации мутаций, например, мутация NPM1 имеет благоприятный прогноз только в отсутствие мутации FLT3-ITD (или FLT3-ITD с низким аллельным соотношением), тогда как одновременное присутствие мутаций NPM1 и FLT3-ITD (с высоким аллельным соотношением) определяет пациентов в промежуточную группу риска. Кроме того, многие

исследования показывают, что мутации генов RUNX1 (AML1), ASXL1, TP53 служат независимыми факторами неблагоприятного прогноза [25].

### **1.3 Миелопролиферативные неоплазмы**

Ph-негативные миелопролиферативные новообразования (Ph-МПН) – группа патологий, включающая в себя несколько Ph-негативных гематологических заболеваний. В данную группу классических Ph-негативных МПН относят: истинную полицитемию (ИП), миелофиброз (МФ), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ). Их происхождение связано с пролиферацией клеточных линий миелопоэза в костном мозге.

Ключевым звеном патогенеза Ph-МПН является неконтролируемая активация клеточного сигнального пути JAK/STAT [26], обусловленная соматическими мутациями в таких генах, как ген янус-киназы (JAK2), ген тромбоцитарного рецептора (MPL) и ген кальретикулина (CALR). Встречаемость JAK2 мутации среди пациентов с ИП составляет 95%, с ЭТ – 50-70%, с МФ – 40-50%. Встречаемость MPL мутаций среди пациентов с МФ и ЭТ составляет 8% и 10%, соответственно. Мутации в гене CALR среди пациентов с МФ и ЭТ встречаются в 35% и 25% случаев, соответственно. Случаи наличия CALR мутаций при ИП в литературе встречаются, но остается неясным клиническое значение таких мутации и их вклад в развитие патогенеза ИП [27].

#### **1.3.1 Строение сигнального пути JAK/STAT**

Понимание механизмов, посредством которых внеклеточный сигнал влияет на активацию транскрипции, значительно продвинулось благодаря изучению передачи сигналов через рецепторы цитокинов. В частности, исследования индукции транскрипции цитокинами (интерфероном  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ) через их рецепторы способствовали пониманию сигнального пути JAK/STAT [28]. У млекопитающих путь JAK/STAT является основным сигнальным механизмом для передачи сигнала от широкого спектра цитокинов и факторов роста.

JAK/STAT сигнальный путь стимулирует пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз клеток. Эти клеточные события играют важную роль для процессов кроветворения, развития иммунитета, адипогенеза и других процессов. Предсказуемо, что мутации, которые конститутивно активируют сигнальный путь JAK/STAT, влияют на эти процессы [29].

JAK/STAT сигнальная система (Janus Kinases –signal transducer and activator of transcription) представляет собой сигнальный путь, состоящий из Янус-киназы (JAK), сигнального белка-трансдуктора и активатора транскрипции (STAT).

У млекопитающих семейство JAK состоит из четырех членов: JAK1, JAK2, JAK 3 и Tyk2. JAK представляют собой мультидоменные белки, состоящие из N-концевого FERM-домена, SH2-подобного домена, псевдокиназного домена (JH2) и каталитически активного домена (JH1). Структура янус-киназы 2 представлена на рисунке 3. Домены FERM и SH2 тесно связаны и образуют единую структурную единицу. Данные домены ответственны за связывание JAK с рецептором. Домен JH2 играет отрицательную роль в ауторегуляции деятельности JAK2, что имеет важное значение в нормальных регуляторных функциях [30]. Домен JH1 является каталитически активным и необходимым для фосфорилирования рецептора и факторов транскрипции STAT.

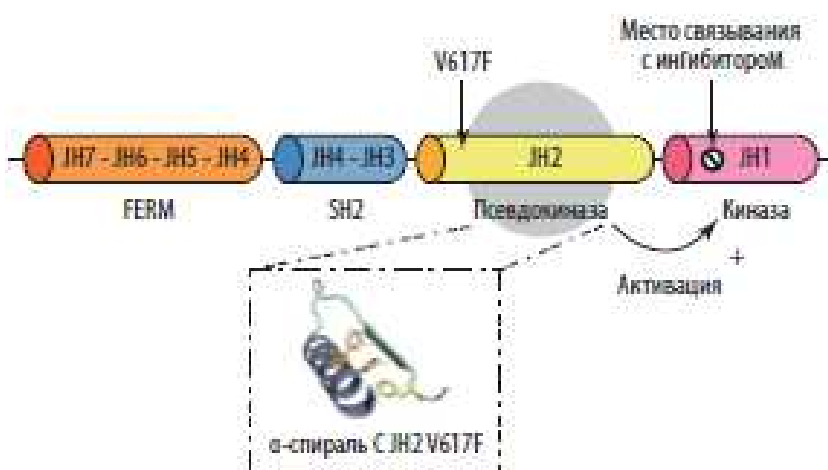


Рисунок 3 – Структура янус-киназы JAK2 [26].

STAT являются латентными факторами транскрипции, которые находятся в цитоплазме до активации. У млекопитающих STAT представляют собой



семейство из семи структурно и функционально связанных белков: STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5a и STAT 5b, STAT 6 [31]. STAT млекопитающих имеют консервативный остаток тирозина вблизи С-конца, который фосфорилируется JAK. Этот фосфотирозин обеспечивает димеризацию STAT посредством взаимодействия с консервативным доменом SH2. Структура STAT представлена на рисунке 4.



Рисунок 4 – Структура STAT [31].

В основе работы сигнального каскада JAK/STAT лежит активность тирозинкиназ класса Jak, которые нековалентно связаны с рецепторами цитокинов [32]. Структура JAK/STAT сигнального пути представлена на рисунке 5.

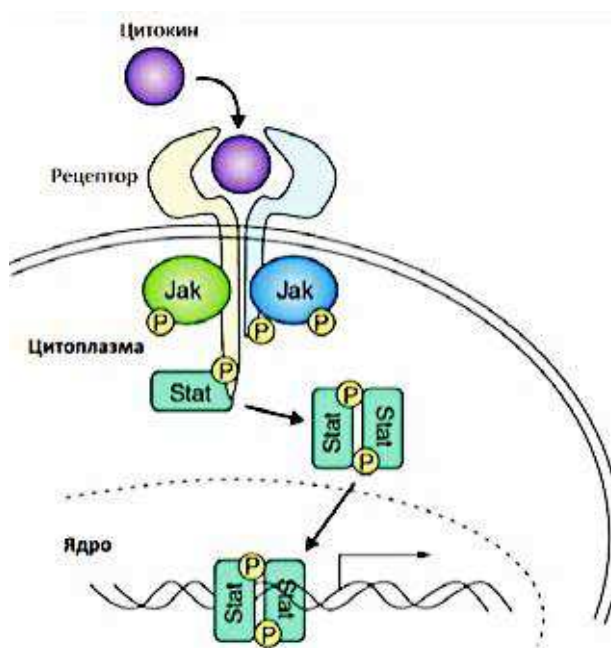


Рисунок 5 – Структура JAK-STAT сигнального пути [32].

Связывание лиганда индуцирует димеризацию рецепторов, что приводит к их активации. При этом тирозинкиназы Jak осуществляют трансфосфорилирование друг друга, а также С-концевых хвостов рецепторов. С образовавшимися остатками фосфотирозина связываются белки STAT, имеющие в своем составе домен SH2. Далее активированные JAK

фосфорилируют белки STAT. Фосфорилированные белки STAT образуют димеры посредством взаимодействия остатков фосфотирозина и SH2-доменов в составе друг друга. Высвободившиеся из комплекса с рецептором STAT проникают в ядро и связываются со специфическими регуляторными последовательностями для активации или репрессии транскрипции генов-мишеней.

### **1.3.2 Мутации генов сигнальных путей**

Молекулярная основа Ph-МПН была частично выяснена в 2005 году, когда была обнаружена мутация JAK2 V617F у большинства пациентов с ИП и примерно у 60% пациентов с ЭТ и МФ [33]. Позднее было обнаружено, что соматические мутации в 12 экзоне гена JAK2 присутствуют у остальных JAK2 V617F негативных пациентов с ИП, в то время как мутации в 10 экзоне гена MPL присутствуют примерно в 5% случаев при ЕТ и МФ [34,35]. Клинические рекомендации ВОЗ 2008 года включали наличие указанных мутаций в основные диагностических критерии диагностики Ph-МПН [4]. Также в 2013 году две научные группы независимо обнаружили и описали наличие различных вариантов соматических мутаций в 9 экзоне гена CALR у 20–25% JAK2- и MPL-негативных пациентов с ЭТ и МФ. В последствие мутации в гене CALR были включены в диагностические критерии ВОЗ 2016 года [2].

JAK2 V617F – соматическая мутация, которая локализована в 14 экзоне гена JAK2. JAK2 V617F характеризуется заменой гуанина на тимин в положении 1849 короткого плеча 9 хромосомы, что в свою очередь приводит к замене валина на фенилаланин в кодоне 617 домена JH2 [36]. Считается, что домен JH2 является аутоингибирующим, а валин 617 играет важную роль в аутоингибировании JAK2-киназы [37]. Таким образом, замена валина на фенилаланин в кодоне 617 приводит к конститутивной киназной активности, приводящей к цитокин-независимой активации JAK-STAT-сигнального пути. Механизм активации

ЈАК-STAT сигнального пути при мутации в гене JAK2 представлен на рисунке 6.

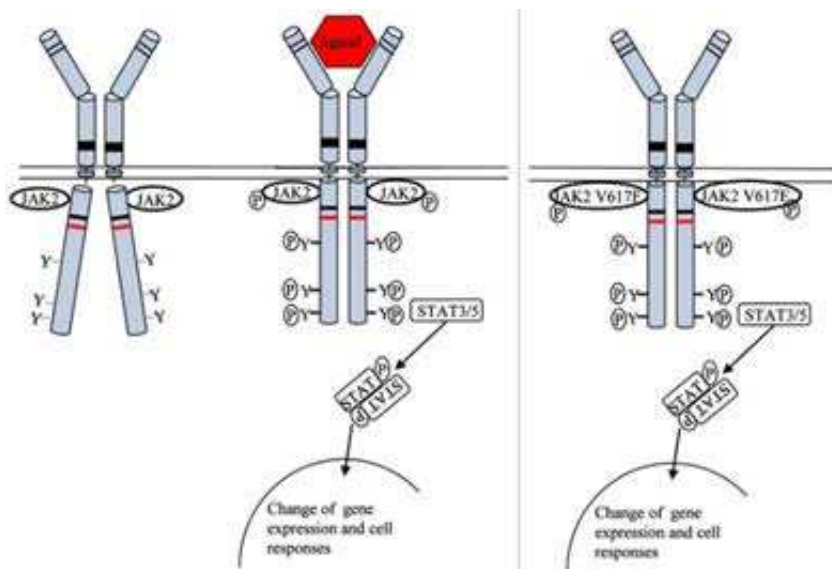


Рисунок 6 – Механизм активации JAK-STAT сигнального пути при мутации в гене JAK2 [37].

На сегодняшний день выявлено большое количество мутаций в 12 экзоне гена JAK2. Наиболее распространёнными мутациями являются: N542-E543del, E543-D544del, F537-K539delinsL, K539L, и R541-E543delinsK [38]. Эти мутации затрагивают регион, связанный с доменами JH2 и JH3 (рисунок 7). Они модифицируют структуру домена JH2, что приводит к модификации ответа на воздействие фактора роста и формированию фенотипа Ph-МПН.

Мутации 12 экзона гена JAK2 вызывают цитокин-независимую/гиперчувствительную пролиферацию в клеточных линиях, экспрессирующих рецептор эритропоэтина, и конститутивную активацию передачи сигналов JAK-STAT.

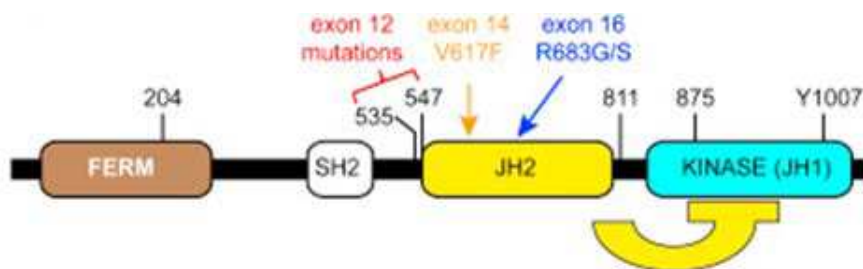


Рисунок 7 – Локализация мутаций JAK2 [38].

Мутация MPLW515L локализована в 10 экзоне гена MPL. В результате данной мутации происходит замена гуанина на тимин в положении 1544 короткого плеча 1 хромосомы. Мутация MPL W515L обуславливает изменения в юкстамембранном домене тромбопоэтинового рецептора (рисунок 8).

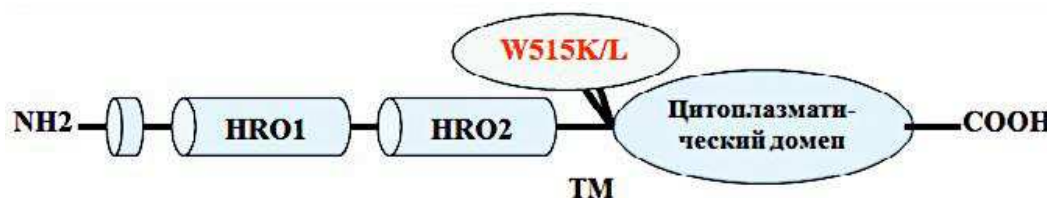


Рисунок 8 – Структура гена рецептора тромбопоэтина (MPL) и локализация соматических мутаций W515K/L [39].

Юкстамембранный домен играет важную роль в поддержании рецептора в его неактивном состоянии при отсутствии лиганда [39]. Таким образом, мутация MPLW515L приводит к потере контроля над активацией рецептора тромбопоэтина и активации сигнального пути JAK-STAT.

### 1.3.3 Соматические мутации в гене кальретикулина (CALR)

Кальретикулин это многофункциональный белок, состоящий из 417 аминокислот, молекулярным весом 46 кДа, который преимущественно локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ER) [40]. Белок состоит из трех основных областей: первая область представляет собой N-концевой лектин связывающий домен, он содержит 8 антипараллельных нитей [41]. Дисульфидная связь, образованная остатками цистеина в N-домене, может взаимодействовать с Р-доменом для создания важной шаперонной функции. Вторая область – это богатый пролином домен Р, который содержит два набора трех повторяющихся регионов [42]. Эти повторяющиеся аминокислотные последовательности образуют лектиноподобные шапероновые структуры, которые ответственны за фолдинг CALR. Третья область – С-домен, который содержит несколько сайтов и имеет очень важное значение для присоединения  $\text{Ca}^{2+}$ . Известно, что связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с этой областью играет важную роль во

взаимодействии с другими белками шаперонами в ER. Кроме того, С-конец содержит сигнальную последовательность (KDEL), определяющую локализацию этого белка в эндоплазматическом ретикулуме. CALR также может концентрироваться в цитозоле и на поверхности клетки. Помимо этого, С-домен имеет важное значение при миграции CALR из просвета ЭР в цитозоль [43]. Исследования показали, что процесс миграции инициируется истощением ЭР  $Ca^{2+}$ .

Ген CALR расположен на коротком плече 19 хромосомы и состоит из 9 экзонов. К настоящему времени в гене CALR было обнаружено более 50 различных мутаций, среди которых, наиболее распространенными являются: делеция 52 bp (Тип-1; c.1099\_1150del; L367fs \* 46), и вставка 5 bp (Тип-2; c.1154\_1155insTTGTC; K385fs \* 47). Встречаемость этих двух мутаций составляет 88% от всех мутаций в гене CALR. Оставшиеся 12% включают в себя другие делеции или вставки или их комбинации, которые либо уникальны, либо обнаружены у небольшого числа пациентов.

Мутации в 9 экзоне гена CALR приводят к сдвигу рамки считывания, что в свою очередь влечет к изменению аминокислотной последовательности белка. Все изменения аминокислотной последовательности локализуются в концевой части белка (С-домене). В С-домене происходит замена отрицательно заряженных аминокислот на положительно заряженные (аргинин и метионин) [44]. Кроме того, последние 4 аминокислоты кальретикулина содержат сигнал удерживания в эндоплазматическом ретикулуме. Этот сигнал отсутствует в мутантном кальретикулине, что приводит к миграции белка в цитозоль и присоединению С-концевого домена к рецептору MPL, что индуцирует структурные изменения в рецепторе, достаточные для активации JAK2. Активированная JAK2 фосфорилирует сигнальные молекулы ERK1/2 и STAT5. Конечным результатом связывания мутантного белка CALR с рецептором MPL является лиганд-независимая активация JAK-STAT пути, приводящая к пролиферации клеток миелоидного клона [45]. На рисунке 9 показано

схематическое изображение взаимодействия мутантного белка CALR с рецептором MPL.

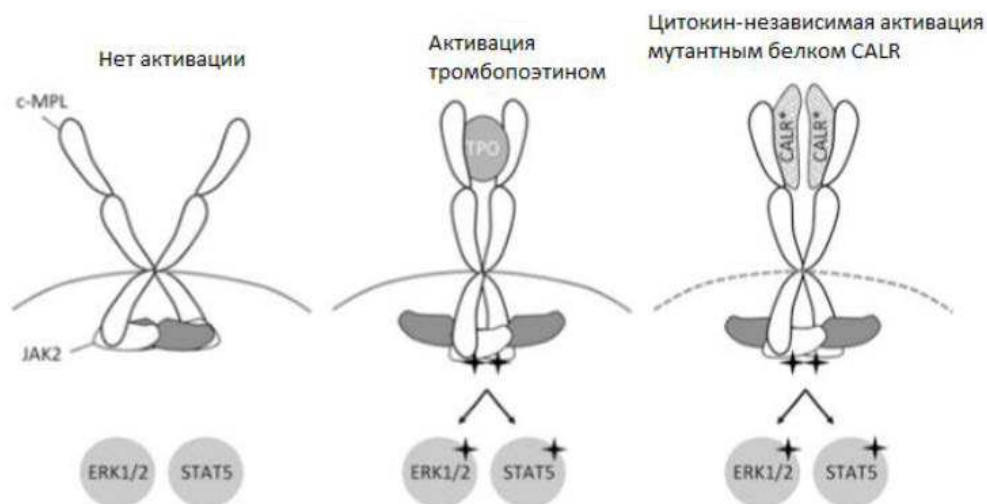


Рисунок 9 – Активация рецептора тромбопоэтина c-MPL мутантным белком CALR [46].

Таким образом, участие данной мутации в активации JAK-STAT-пути выражается в цитокин-независимой активации тромбопоэтинового рецептора.

#### 1.4 Методы выявления мутаций в гене FLT3

Анализ мутаций в гене FLT3 наряду с определением хромосомных aberrаций используется для оценки прогностического риска и подбора таргетных препаратов.

Выявление мутаций в гене FLT3 осложняется их локализацией в двух участках гена, а также варьированием размеров возможной tandemной дупликации (от 3 до 1236 нуклеотидов). В настоящее время для определения мутационного статуса FLT3 используется большое количество разнообразных молекулярно-генетических методов: ПЦР с последующим агарозным электрофорезом, секвенирование по Сэнгеру, фрагментный анализ, высокопроизводительное секвенирование [47-51]. Данные методы различаются по чувствительности и времени выполнения.

ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле является широкодоступным методом выявления мутаций, однако имеет ряд ограничений

[47]. Нередко tandemный повтор может состоять всего из нескольких нуклеотидов, в таком случае становятся невозможным отличить мутантный продукт от основного. В данном случае для выявления ITD-FLT3 лучше всего подходит фрагментный анализ. Этот метод обладает высокой степенью разрешения и позволяет разделять фрагменты, слабо различающиеся по размеру. Однако данный метод имеет ограничение чувствительности в диапазоне 5-10% [48].

Секвенирование по Сэнгеру и высокопроизводительное секвенирование подходят для точного определения длины и места вставки нуклеотидной последовательности. Однако являются дорогостоящими методами и требуют экспертной оценки при анализе результатов [50,51].

### **1.5 Методы выявления мутаций в гене CALR**

Мутации в гене CALR обуславливают развитие клинической картины ЭТ и МФ и предлагаются в качестве обязательного лабораторного теста для подтверждения диагноза.

К настоящему времени в гене CALR было обнаружено более 50 различных мутаций, среди которых наиболее распространенными являются: делеция 52 bp (Тип-1; c.1099\_1150del; L367fs \* 46), и вставка 5 bp (Тип-2; c.1154\_1155insTTGTC; K385fs \* 47). Встречаемость этих двух мутаций составляет 88% от всех мутаций в гене CALR. Оставшиеся 12% включают в себя другие делеции или вставки или их комбинации, которые либо уникальны, либо обнаружены у небольшого числа пациентов.

На данный момент для выявления соматических мутаций в гене CALR, используется большое количество разнообразных молекулярно-генетических методов. Среди наиболее распространенных можно отметить следующие: секвенирование по Сэнгеру [52], фрагментный анализ [53], анализ кривых плавления с высоким разрешением [54], ПЦР в реальном времени с

использованием зондов TaqMan [55], высокопроизводительное секвенирование [56].

Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки при выявлении мутаций в гене CALR. Например, ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan, имеет ограниченные возможности для обнаружения многочисленных мутаций в гене CALR, поскольку позволяет определить лишь те мутации, на которые непосредственно отжигается праймер. Секвенирование по Сэнгеру и фрагментный анализ имеют ограниченную чувствительность в диапазоне 10-25% и 5-10%, соответственно [52]. Высокопроизводительное секвенирование обеспечивает наименьший порог обнаружения (1-1.5%), но все еще остается дорогостоящей и требует много времени на подготовку, не говоря уже о последующем трудоемком аналитическом этапе [57].

## **1.6 High Resolution Melt**

High Resolution Melt (плавление высокого разрешения или HRM анализ) – это новый метод анализа кривых плавления последовательностей ДНК с высоким разрешением, разработанный IdahoTechnology и университетом из штата Юта в США [58]. Данный анализ проводится на амплификаторах в режиме реального времени.

Первым этапом протокола HRM является амплификация интересующего участка с использованием стандартной техники ПЦР в присутствии специализированного красителя, связывающегося с двухцепочечной ДНК (дцДНК). Для проведения анализа кривых плавления высокого разрешения рекомендуют использовать насыщающие интеркалирующие красители, такие как EvaGreen, LCGreen и SYTO9, поскольку при использовании ненасыщающего красителя, такого как SYBRGreen, молекулы красителя во время плавления ДНК могут перемещаться на нерасплавленные участки двухцепочечной ДНК, результатом чего является незначительное или неравномерное изменение температуры на кривой ДНК (рисунок 10).



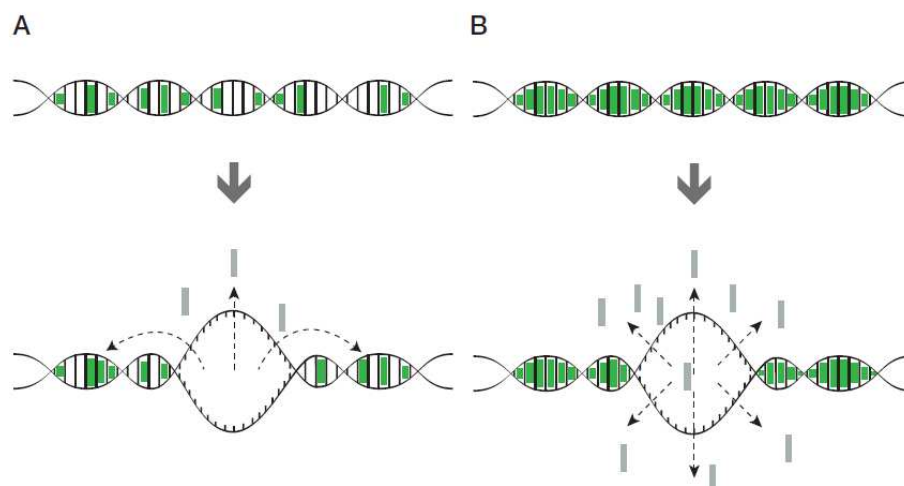


Рисунок 10 – Отличие и преимущество красителя Eva Green (B) от SYBR Green (A).

Вторым этапом протокола HRM является получение кривых плавления ДНК. Кривые плавления получают путем измерения уменьшения флуоресценции при медленном увеличении температуры с высоким уровнем точности ( $0,05\text{--}0,1\text{C}^\circ$ ). Флуоресценция уменьшается на каждом этапе из-за перехода ДНК от двухцепочечной к одноцепочечной.

С помощью программного обеспечения данные об изменении уровня флуоресценции в зависимости от температуры преобразуются в график [59]. Помимо этого, сигналы флуоресценции нормализуются до относительных значений 1 и 0, что способствует устранению различий фоновой флуоресценции и повышению способности детектирования незначительных профилей плавления. Для упрощения визуального анализа строят дифференциальные графики зависимости  $dF$  флуоресценции от  $dT$  температуры [59].

Температура плавления ампликона, при которой ДНК денатурирует, полностью предсказуема. Это зависит от последовательности оснований ДНК. Если вы сравниваете два образца от двух разных людей, они должны дать одинаковую кривую плавления. Однако, если один человек имеет мутацию в анализируемой области ДНК, то это приведет к изменению температуры плавления, при которой нить ДНК расплавится друг от друга. Разница, представленная на рисунке 11, между двумя этими кривыми плавления может

быть очень маленькой, но HRM анализ, приборы и программное обеспечение имеет возможность контролировать этот процесс «высокого разрешения», можно точно документировать эти изменения и, следовательно, определить наличие или отсутствие мутации.

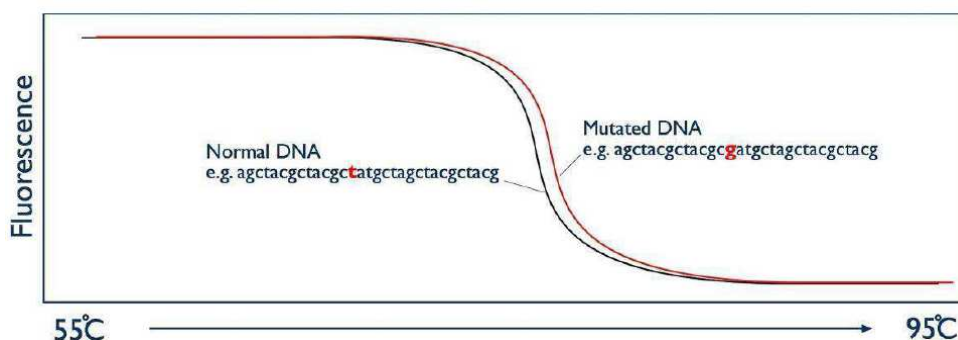


Рисунок 11 – Изменение температуры плавления при однонуклеотидной замене.

Анализ гомо- и гетерозиготных образцов имеет ряд особенностей: реакция ПЦР, которая содержит только один тип последовательности ДНК, такой как гомозиготные матрицы диплоидных организмов, дает кривую плавления с одним пиком. Реакция ПЦР содержащая гетерозиготные матрицы приводят к образованию смеси гомо- и гетеродуплексов. Из-за несовершенного связывания их цепей температура плавления в гетерополимерах сильно снижается, что приводит к раннему пику на кривой (рисунок 12).

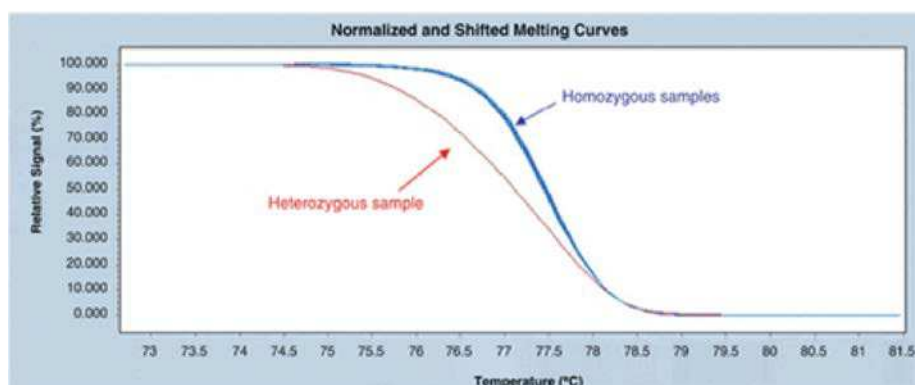


Рисунок 12 – Кривые плавления от гомо- и гетерозиготных образцов

Метод HRM имеет преимущество обнаружения неизвестных мутаций. Он является простым и быстрым методом скрининга мутаций: никакие

дополнительные приборы не требуется после ПЦР-амплификации. Этап кривых плавления с высоким разрешением можно добавить к концу амплификации, а после завершения анализировать специальным программным обеспечением.

## **2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Объект исследования**

Исследование было выполнено на базе НПЛМГМИ СФУ в г. Красноярске. Для проведения скринингового исследования соматических мутаций в генах FLT3 и CALR методом HRM-анализа использовались образцы ДНК от 2 пациентов с подтверждённым диагнозом ОМЛ и от 5 пациентов с диагнозом Ph-МПН. Наличие мутаций в генах FLT3 и CALR, а также уровень аллельной нагрузки были определены ранее методами фрагментного анализа и пиросеквенирования соответственно. В качестве контролей использовали 5 образцов ДНК без мутаций в анализируемом участке гена FLT3 и 2 образца ДНК без мутаций в гене CALR. Отсутствие каких-либо мутаций и полиморфизмов в исследуемых областях было подтверждено секвенированием по методу Сэнгера.

### **2.2 Выделение ДНК из клинического материала с использованием реагента «ДНК-сорб-В»**

Выделение ДНК из цельной крови с использованием реагента «ДНК- сорб-В» («АмплиСенс») проводилось по следующей методике:

- 1) Достать из набора «ДНК-сорб-В» лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 и поставить на нагревающуюся поверхность термостата, на термостате выбрать «Режим 1» и температуру 65°C.

- 2) Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок типа Eppendorf на 1,5 мл. Подписать пробирки (на крышке пробирки № пробы; на боковой поверхности: № пробы, фамилия пациента, дата выделения ДНК). Если необходимо, выделить отдельную пробирку для отрицательного контрольного образца (ОКО), на ней подписать «ОКО» и дату, отставить эту пробирку в сторону. В пробирки (во все, кроме «ОКО») добавить по 1 мл гемолетика (одним наконечником). Затем внести в пробирки с гемолитиком по 250 мкл исследуемой цельной крови (кровь предварительно перемешать пипетированием (если она

находится в «эппендорфе») или переворачиванием 5-6 раз (если она находится в «вакутейнере»)), закрыть крышку и перемешать на вортексе.

3) Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин, еще раз перемешать на вортексе и оставить еще на 5 мин.

4) Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс об/мин в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать, не задевая осадка, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

5) После отмывки осадок клеток должен быть белым, допускается наличие только небольшого налета розоватого цвета над осадком (остатки разрушенных эритроцитов).

6) В пробирку «ОКО» добавить 100 мкл ОКО (из набора для секвенирования или др.).

7) Внести в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора (одним наконечником).

8) Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге.

9) Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.

10) Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

11) Добавить в пробы по 300 мкл раствора для отмывки 1 (одним наконечником), перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

12) Добавить в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2 (одним наконечником), перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.

13) Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.

14) Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

15) В пробирки добавить по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.

16) Процентрифугировать пробирки при 13 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК.

### **2.3 Измерение концентрации ДНК**

Измерение концентрации ДНК проводилось с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen). Действие этого метода основано на том, что специфичный флуоресцентный краситель связывается только с молекулой-мишенью (в данном случае с ДНК) и определяет точную концентрацию ДНК в образце.

Измерение концентрации ДНК с использованием набора реагентов Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen) производилось согласно следующей методике:

- 1) Разморозить все реагенты при комнатной температуре.
- 2) Наставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов ДНК плюс 2 стандарта. Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.
- 3) Приготовить рабочую смесь:  $1 \times n$  мкл реагента +  $199 \times n$  мкл буфера

- 4) Раскапать в пробирки:
  - а) для стандартов 190 мкл рабочей смеси + 10 мкл стандарта;
  - б) для исследуемых образцов: 199-180 мкл рабочей смеси + 1-20 мкл ДНК.
- 5) Вortexировать 2-3 сек, сбросить капли.
- 6) Инкубировать 2 мин.
- 7) Включить Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажать любую кнопку для перехода в рабочий режим.
- 8) Выбрать вид анализа (dsDNA HS Assay), используя кнопки ↑ и ↓. Нажать GO.
- 9) Произвести калибровку:
  - а) Выбрать старую калибровку – Use last calibration. Нажать GO.ИЛИ
  - б) Произвести калибровку заново:
    - вставить Стандарт №1, нажать GO;
    - вставить Стандарт №2, нажать GO.
- 10) Вставить исследуемую пробу, нажать GO. На экране появится число.
- 11) Рассчитать концентрацию ДНК в исходном образце: выбрать Calculate sample concentration используя кнопки ↑ и ↓, нажать GO.
- 12) Записать результат.
- 13) Убрать исследуемую пробу из прибора, вставить следующую и нажать GO.

## **2.4 Проведение ПЦР-HRM с использованием комплекта реагентов Precision Melt Supermix (Bio-Rad, США)**

ПЦР-HRM или ПЦР с дополнительным этапом плавления высокого разрешения проводили с использованием набора реагентов Precision Melt Supermix (bio-Rad, США) в присутствии Eva Green dye. Количество реагентов, вносимых в одну пробу, представлено в таблице 2. Реагенты добавляли в соответствии с рекомендациями производителя набора реагентов.

Таблица 2 – Количество реагентов на одну пробу ПЦР-HRM

Реагенты		Количество на одну пробу, мкл
Precision Melt Supermix		5
Праймеры	Прямой	0,5
	Обратный	0,5
Образец ДНК		4

В зависимости от количества проб готовили общую смесь N в одной пробирке. Праймеры для 9 экзона гена CALR были заимствованы из статьи [60]. Данные праймеры фланкируют участок 9 экзона длиной 265 пар оснований:

Forward:5'-GGCAAGGCCCTGAGGTGT-3';

Reverse:5'-GGCCTCAGTCCAGCCCTG-3'.

Праймеры для гена FLT3 были заимствованы из статьи [61]. Данные праймеры фланкируют участок длиной 326 пар оснований и полностью охватывают 14 экзон гена FLT3, начало 15 экзона и интрон, располагающийся между ними:

Forward:5'- TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA-3';

Reverse:5'- TTCCATAAGCTGTTGCGTTCATCAC-3'.

Общую смесь раскапывали по 6 мкл в каждую пробирку. Далее в пробирки вносили по 4мкл образцов ДНК, при этом концентрация вносимой ДНК в реакционную пробу составляло 4 нг/мкл. Пробирки центрифугируют на микроцентрифуге для сброса капель. Затем пробирки помещают в прибор для амплификации. Программа амплификации участков гена FLT3 и CALR с дополнительным этапом плавления высокого разрешения представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Программа амплификации участка гена FLT3 и CALR

Температура, С	Время, мин	Количество циклов
95	2:00	1
95	0:10	40
62-для гена FLT3; 57-для гена CALR	0:30	40
72	0:30	40
95	0:30	1
60	1:00	1
65-95 (с шагом в 0,2 С)	10 сек/шаг	1



ПЦР с дополнительным этапом плавления высокого разрешения проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США).

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Разработаны тест-системы для выявления соматических мутаций в генах FLT3 и CALR на основе HRM-анализа.
2. Во всех проанализированных методом HRM-анализа образцах ДНК от пациентов с диагнозом ОМЛ и Ph-МПН выявлены соответствующие мутации в генах FLT3 и CALR.
3. Тип выявленных методом HRM-анализа мутаций во всех образцах совпал с мутациями, выявленными при использовании других молекулярно-генетических технологий.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОЛ – острый лейкоз

ХЛ – хронический лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ЦН-ОМЛ – цитогенетически-нормальный острый миелоидный лейкоз

РТК – мембраносвязанная рецепторная тирозинкиназа

ТМ – трансмембранный домен

JM – юкта-мембранный домен

TKD – внутриклеточный киназный домен

KI – киназная вставка

ITD – тандемная дупликация нуклеотидов

ПР – полные ремиссии

Ph-МПН – Ph - негативные миелопролиферативные новообразования

ИП – истинная полицитемия

МФ – миелофиброз

ЭТ – эссенциальная тромбоцитемия

JAK2 – ген янус-киназы

MPL – ген, кодирующий рецептор к тромбопоэтину

CALR – ген кальретикулина

JAK-STAT – Janus Kinases — signal transducer and activator of transcription

JH2 – псевдокиназный домен

JH1 – каталитически активный домен

ЭР – эндоплазматический ретикулум

HRM – High Resolution Melt

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Swerdlow, S. H. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / S. H. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri, [et al.] // Blood. – 2016. – Vol. 127, №. 20. – P. 2375–2390.
2. Arber, D. A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D. A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, [et al.] // Blood. – 2016. – Vol. 127, №. 20. – P. 2391–2405.
3. Bennett, J. M. Proposals for the classification of the acute leukaemias French –/American-British-French (FAB) system – open  
M. T. Daniel, [et al.] // British journal of haematology. – 1976. – Vol. 33, №. 4. – P. 451–458.
4. Vardiman, J. W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / J. W. Vardiman, J. Thiele, D. A. Arber, [et al.] // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2009. – Vol. 114, №. 5. – P. 937–951.
5. Schoch, C. Cytogenetics in acute myeloid leukemia / C. Schoch, T. Haferlach // Current oncology reports. – 2002. – Vol. 4, №. 5. – P. 390–397.
6. Rowley, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining / J. D. Rowley // Nature. – 1973. – Vol. 243, №. 5405. – P. 290–293.
7. Harrison, C. J. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12 / C. J. Harrison, R. K. Hills, A. V. Moorman, [et al.] // Journal of clinical oncology. – 2010. – Vol. 28, №. 16. – P. 2674–2681.
8. Miyoshi, H. The t (8; 21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1  
in M1/M2/M3/M4/M5/M6/M7/M8/M9/M10/M11/M12/M13/M14/M15/M16/M17/M18/M19/M20/M21/M22/M23/M24/M25/M26/M27/M28/M29/M30/M31/M32/M33/M34/M35/M36/M37/M38/M39/M40/M41/M42/M43/M44/M45/M46/M47/M48/M49/M50/M51/M52/M53/M54/M55/M56/M57/M58/M59/M60/M61/M62/M63/M64/M65/M66/M67/M68/M69/M70/M71/M72/M73/M74/M75/M76/M77/M78/M79/M80/M81/M82/M83/M84/M85/M86/M87/M88/M89/M90/M91/M92/M93/M94/M95/M96/M97/M98/M99/M100/M101/M102/M103/M104/M105/M106/M107/M108/M109/M110/M111/M112/M113/M114/M115/M116/M117/M118/M119/M120/M121/M122/M123/M124/M125/M126/M127/M128/M129/M130/M131/M132/M133/M134/M135/M136/M137/M138/M139/M140/M141/M142/M143/M144/M145/M146/M147/M148/M149/M150/M151/M152/M153/M154/M155/M156/M157/M158/M159/M160/M161/M162/M163/M164/M165/M166/M167/M168/M169/M170/M171/M172/M173/M174/M175/M176/M177/M178/M179/M180/M181/M182/M183/M184/M185/M186/M187/M188/M189/M190/M191/M192/M193/M194/M195/M196/M197/M198/M199/M200/M201/M202/M203/M204/M205/M206/M207/M208/M209/M210/M211/M212/M213/M214/M215/M216/M217/M218/M219/M220/M221/M222/M223/M224/M225/M226/M227/M228/M229/M230/M231/M232/M233/M234/M235/M236/M237/M238/M239/M240/M241/M242/M243/M244/M245/M246/M247/M248/M249/M250/M251/M252/M253/M254/M255/M256/M257/M258/M259/M260/M261/M262/M263/M264/M265/M266/M267/M268/M269/M270/M271/M272/M273/M274/M275/M276/M277/M278/M279/M280/M281/M282/M283/M284/M285/M286/M287/M288/M289/M290/M291/M292/M293/M294/M295/M296/M297/M298/M299/M300/M301/M302/M303/M304/M305/M306/M307/M308/M309/M310/M311/M312/M313/M314/M315/M316/M317/M318/M319/M320/M321/M322/M323/M324/M325/M326/M327/M328/M329/M330/M331/M332/M333/M334/M335/M336/M337/M338/M339/M340/M341/M342/M343/M344/M345/M346/M347/M348/M349/M350/M351/M352/M353/M354/M355/M356/M357/M358/M359/M360/M361/M362/M363/M364/M365/M366/M367/M368/M369/M370/M371/M372/M373/M374/M375/M376/M377/M378/M379/M380/M381/M382/M383/M384/M385/M386/M387/M388/M389/M390/M391/M392/M393/M394/M395/M396/M397/M398/M399/M400/M401/M402/M403/M404/M405/M406/M407/M408/M409/M410/M411/M412/M413/M414/M415/M416/M417/M418/M419/M420/M421/M422/M423/M424/M425/M426/M427/M428/M429/M430/M431/M432/M433/M434/M435/M436/M437/M438/M439/M440/M441/M442/M443/M444/M445/M446/M447/M448/M449/M450/M451/M452/M453/M454/M455/M456/M457/M458/M459/M460/M461/M462/M463/M464/M465/M466/M467/M468/M469/M470/M471/M472/M473/M474/M475/M476/M477/M478/M479/M480/M481/M482/M483/M484/M485/M486/M487/M488/M489/M490/M491/M492/M493/M494/M495/M496/M497/M498/M499/M500/M501/M502/M503/M504/M505/M506/M507/M508/M509/M510/M511/M512/M513/M514/M515/M516/M517/M518/M519/M520/M521/M522/M523/M524/M525/M526/M527/M528/M529/M530/M531/M532/M533/M534/M535/M536/M537/M538/M539/M540/M541/M542/M543/M544/M545/M546/M547/M548/M549/M550/M551/M552/M553/M554/M555/M556/M557/M558/M559/M560/M561/M562/M563/M564/M565/M566/M567/M568/M569/M570/M571/M572/M573/M574/M575/M576/M577/M578/M579/M580/M581/M582/M583/M584/M585/M586/M587/M588/M589/M590/M591/M592/M593/M594/M595/M596/M597/M598/M599/M600/M601/M602/M603/M604/M605/M606/M607/M608/M609/M610/M611/M612/M613/M614/M615/M616/M617/M618/M619/M620/M621/M622/M623/M624/M625/M626/M627/M628/M629/M630/M631/M632/M633/M634/M635/M636/M637/M638/M639/M640/M641/M642/M643/M644/M645/M646/M647/M648/M649/M650/M651/M652/M653/M654/M655/M656/M657/M658/M659/M660/M661/M662/M663/M664/M665/M666/M667/M668/M669/M670/M671/M672/M673/M674/M675/M676/M677/M678/M679/M680/M681/M682/M683/M684/M685/M686/M687/M688/M689/M690/M691/M692/M693/M694/M695/M696/M697/M698/M699/M700/M701/M702/M703/M704/M705/M706/M707/M708/M709/M710/M711/M712/M713/M714/M715/M716/M717/M718/M719/M720/M721/M722/M723/M724/M725/M726/M727/M728/M729/M730/M731/M732/M733/M734/M735/M736/M737/M738/M739/M740/M741/M742/M743/M744/M745/M746/M747/M748/M749/M750/M751/M752/M753/M754/M755/M756/M757/M758/M759/M760/M761/M762/M763/M764/M765/M766/M767/M768/M769/M770/M771/M772/M773/M774/M775/M776/M777/M778/M779/M780/M781/M782/M783/M784/M785/M786/M787/M788/M789/M790/M791/M792/M793/M794/M795/M796/M797/M798/M799/M800/M801/M802/M803/M804/M805/M806/M807/M808/M809/M810/M811/M812/M813/M814/M815/M816/M817/M818/M819/M820/M821/M822/M823/M824/M825/M826/M827/M828/M829/M830/M831/M832/M833/M834/M835/M836/M837/M838/M839/M840/M841/M842/M843/M844/M845/M846/M847/M848/M849/M850/M851/M852/M853/M854/M855/M856/M857/M858/M859/M860/M861/M862/M863/M864/M865/M866/M867/M868/M869/M870/M871/M872/M873/M874/M875/M876/M877/M878/M879/M880/M881/M882/M883/M884/M885/M886/M887/M888/M889/M890/M891/M892/M893/M894/M895/M896/M897/M898/M899/M900/M901/M902/M903/M904/M905/M906/M907/M908/M909/M910/M911/M912/M913/M914/M915/M916/M917/M918/M919/M920/M921/M922/M923/M924/M925/M926/M927/M928/M929/M930/M931/M932/M933/M934/M935/M936/M937/M938/M939/M940/M941/M942/M943/M944/M945/M946/M947/M948/M949/M950/M951/M952/M953/M954/M955/M956/M957/M958/M959/M960/M961/M962/M963/M964/M965/M966/M967/M968/M969/M970/M971/M972/M973/M974/M975/M976/M977/M978/M979/M980/M981/M982/M983/M984/M985/M986/M987/M988/M989/M990/M991/M992/M993/M994/M995/M996/M997/M998/M999/M1000/M1001/M1002/M1003/M1004/M1005/M1006/M1007/M1008/M1009/M1010/M1011/M1012/M1013/M1014/M1015/M1016/M1017/M1018/M1019/M1020/M1021/M1022/M1023/M1024/M1025/M1026/M1027/M1028/M1029/M1030/M1031/M1032/M1033/M1034/M1035/M1036/M1037/M1038/M1039/M1040/M1041/M1042/M1043/M1044/M1045/M1046/M1047/M1048/M1049/M1050/M1051/M1052/M1053/M1054/M1055/M1056/M1057/M1058/M1059/M1060/M1061/M1062/M1063/M1064/M1065/M1066/M1067/M1068/M1069/M1070/M1071/M1072/M1073/M1074/M1075/M1076/M1077/M1078/M1079/M1080/M1081/M1082/M1083/M1084/M1085/M1086/M1087/M1088/M1089/M1090/M1091/M1092/M1093/M1094/M1095/M1096/M1097/M1098/M1099/M1100/M1101/M1102/M1103/M1104/M1105/M1106/M1107/M1108/M1109/M1110/M1111/M1112/M1113/M1114/M1115/M1116/M1117/M1118/M1119/M1120/M1121/M1122/M1123/M1124/M1125/M1126/M1127/M1128/M1129/M1130/M1131/M1132/M1133/M1134/M1135/M1136/M1137/M1138/M1139/M1140/M1141/M1142/M1143/M1144/M1145/M1146/M1147/M1148/M1149/M1150/M1151/M1152/M1153/M1154/M1155/M1156/M1157/M1158/M1159/M1160/M1161/M1162/M1163/M1164/M1165/M1166/M1167/M1168/M1169/M1170/M1171/M1172/M1173/M1174/M1175/M1176/M1177/M1178/M1179/M1180/M1181/M1182/M1183/M1184/M1185/M1186/M1187/M1188/M1189/M1190/M1191/M1192/M1193/M1194/M1195/M1196/M1197/M1198/M1199/M1200/M1201/M1202/M1203/M1204/M1205/M1206/M1207/M1208/M1209/M1210/M1211/M1212/M1213/M1214/M1215/M1216/M1217/M1218/M1219/M1220/M1221/M1222/M1223/M1224/M1225/M1226/M1227/M1228/M1229/M1230/M1231/M1232/M1233/M1234/M1235/M1236/M1237/M1238/M1239/M1240/M1241/M1242/M1243/M1244/M1245/M1246/M1247/M1248/M1249/M1250/M1251/M1252/M1253/M1254/M1255/M1256/M1257/M1258/M1259/M1260/M1261/M1262/M1263/M1264/M1265/M1266/M1267/M1268/M1269/M1270/M1271/M1272/M1273/M1274/M1275/M1276/M1277/M1278/M1279/M1280/M1281/M1282/M1283/M1284/M1285/M1286/M1287/M1288/M1289/M1290/M1291/M1292/M1293/M1294/M1295/M1296/M1297/M1298/M1299/M1300/M1301/M1302/M1303/M1304/M1305/M1306/M1307/M1308/M1309/M1310/M1311/M1312/M1313/M1314/M1315/M1316/M1317/M1318/M1319/M1320/M1321/M1322/M1323/M1324/M1325/M1326/M1327/M1328/M1329/M1330/M1331/M1332/M1333/M1334/M1335/M1336/M1337/M1338/M1339/M1340/M1341/M1342/M1343/M1344/M1345/M1346/M1347/M1348/M1349/M1350/M1351/M1352/M1353/M1354/M1355/M1356/M1357/M1358/M1359/M1360/M1361/M1362/M1363/M1364/M1365/M1366/M1367/M1368/M1369/M1370/M1371/M1372/M1373/M1374/M1375/M1376/M1377/M1378/M1379/M1380/M1381/M1382/M1383/M1384/M1385/M1386/M1387/M1388/M1389/M1390/M1391/M1392/M1393/M1394/M1395/M1396/M1397/M1398/M1399/M1400/M1401/M1402/M1403/M1404/M1405/M1406/M1407/M1408/M1409/M1410/M1411/M1412/M1413/M1414/M1415/M1416/M1417/M1418/M1419/M1420/M1421/M1422/M1423/M1424/M1425/M1426/M1427/M1428/M1429/M1430/M1431/M1432/M1433/M1434/M1435/M1436/M1437/M1438/M1439/M1440/M1441/M1442/M1443/M1444/M1445/M1446/M1447/M1448/M1449/M1450/M1451/M1452/M1453/M1454/M1455/M1456/M1457/M1458/M1459/M1460/M1461/M1462/M1463/M1464/M1465/M1466/M1467/M1468/M1469/M1470/M1471/M1472/M1473/M1474/M1475/M1476/M1477/M1478/M1479/M1480/M1481/M1482/M1483/M1484/M1485/M1486/M1487/M1488/M1489/M1490/M1491/M1492/M1493/M1494/M1495/M1496/M1497/M1498/M1499/M1500/M1501/M1502/M1503/M1504/M1505/M1506/M1507/M1508/M1509/M1510/M1511/M1512/M1513/M1514/M1515/M1516/M1517/M1518/M1519/M1520/M1521/M1522/M1523/M1524/M1525/M1526/M1527/M1528/M1529/M1530/M1531/M1532/M1533/M1534/M1535/M1536/M1537/M1538/M1539/M1540/M1541/M1542/M1543/M1544/M1545/M1546/M1547/M1548/M1549/M1550/M1551/M1552/M1553/M1554/M1555/M1556/M1557/M1558/M1559/M1560/M1561/M1562/M1563/M1564/M1565/M1566/M1567/M1568/M1569/M1570/M1571/M1572/M1573/M1574/M1575/M1576/M1577/M1578/M1579/M1580/M1581/M1582/M1583/M1584/M1585/M1586/M1587/M1588/M1589/M1590/M1591/M1592/M1593/M1594/M1595/M1596/M1597/M1598/M1599/M1600/M1601/M1602/M1603/M1604/M1605/M1606/M1607/M1608/M1609/M1610/M1611/M1612/M1613/M1614/M1615/M1616/M1617/M1618/M1619/M1620/M1621/M1622/M1623/M1624/M1625/M1626/M1627/M1628/M1629/M1630/M1631/M1632/M1633/M1634/M1635/M1636/M1637/M1638/M1639/M1640/M1641/M1642/M1643/M1644/M1645/M1646/M1647/M1648/M1649/M1650/M1651/M1652/M1653/M1654/M1655/M1656/M1657/M1658/M1659/M1660/M1661/M1662/M1663/M1664/M1665/M1666/M1667/M1668/M1669/M1670/M1671/M1672/M1673/M1674/M1675/M1676/M1677/M1678/M1679/M1680/M1681/M1682/M1683/M1684/M1685/M1686/M1687/M1688/M1689/M1690/M1691/M1692/M1693/M1694/M1695/M1696/M1697/M1698/M1699/M1700/M1701/M1702/M1703/M1704/M1705/M1706/M1707/M1708/M1709/M1710/M1711/M1712/M1713/M1714/M1715/M1716/M1717/M1718/M1719/M1720/M1721/M1722/M1723/M1724/M1725/M1726/M1727/M1728/M1729/M1730/M1731/M1732/M1733/M1734/M1735/M1736/M1737/M1738/M1739/M1740/M1741/M1742/M1743/M1744/M1745/M1746/M1747/M1748/M1749/M1750/M1751/M1752/M1753/M1754/M1755/M1756/M1757/M1758/M1759/M1760/M1761/M1762/M1763/M1764/M1765/M1766/M1767/M1768/M1769/M1770/M1771/M1772/M1773/M1774/M1775/M1776/M1777/M1778/M1779/M1780/M1781/M1782/M1783/M1784/M1785/M1786/M1787/M1788/M1789/M1790/M1791/M1792/M1793/M1794/M1795/M1796/M1797/M1798/M1799/M1800/M1801/M1802/M1803/M1804/M1805/M1806/M1807/M1808/M1809/M1810/M1811/M1812/M1813/M1814/M1815/M1816/M1817/M1818/M1819/M1820/M1821/M1822/M1823/M1824/M1825/M1826/M1827/M1828/M1829/M1830/M1831/M1832/M1833/M1834/M1835/M1836/M1837/M1838/M1839/M1840/M1841/M1842/M1843/M1844/M1845/M1846/M1847/M1848/M1849/M1850/M1851/M1852/M1853/M1854/M1855/M1856/M1857/M1858/M1859/M1860/M1861/M1862/M1863/M1864/M1865/M1866/M1867/M1868/M1869/M1870/M1871/M1872/M1873/M1874/M1875/M1876/M1877/M1878/M1879/M1880/M1881/M1882/M1883/M1884/M1885/M1886/M1887/M1888/M1889/M1890/M1891/M1892/M1893/M1894/M1895/M1896/M1897/M1898/M1899/M1900/M1901/M1902/M1903/M1904/M1905/M1906/M1907/M1908/M1909/M1910/M1911/M1912/M1913/M1914/M1915/M1916/M1917/M1918/M1919/M1920/M1921/M1922/M1923/M1924/M1925/M1926/M1927/M1928/M1929/M1930/M1931/M1932/M1933/M1934/M1935/M1936/M1937/M1938/M1939/M1940/M1941/M1942/M1943/M1944/M1945/M1946/M1947/M1948/M1949/M1950/M1951/M1952/M1953/M1954/M1955/M1956/M1957/M1958/M1959/M1960/M1961/M1962/M1963/M1964/M1965/M1966/M1967/M1968/M1969/M1970/M1971/M1972/M1973/M1974/M1975/M1976/M1977/M1978/M1979/M1980/M1981/M1982/M1983/M1984/M1985/M1986/M1987/M1988/M1989/M1990/M1991/M1992/M1993/M1994/M1995/M1996/M1997/M1998/M1999/M2000/M2001/M2002/M2003/M2004/M2005/M2006/M2007/M2008/M2009/M2010/M2011/M2012/M2013/M2014/M2015/M2016/M2017/M2018/M2019/M2020/M2021/M2022/M2023/M2024/M2025/M2026/M2027/M2028/M2029/M2030/M2031/M2032/M2033/M2034/M2035/M2036/M2037/M2038/M2039/M2040/M2041/M2042/M2043/M2044/M2045/M2046/M2047/M2048/M2049/M2050/M2051/M2052/M2053/M2054/M2055/M2056/M2057/M2058/M2059/M2060/M2061/M2062/M2063/M2064/M2065/M2066/M2067/M2068/M2069/M2070/M2071/M2072/M2073/M2074/M2075/M2076/M2077/M2078/M2079/M2080/M2081/M2082/M2083/M2084/M2085/M2086/M2087/M2088/M2089/M2090/M2091/M2092/M2093/M2094/M2095/M2096/M2097/M2098/M2099/M2100/M2101/M2102/M2103/M2104/M2105/M2106/M2107/M2108/M2109/M2110/M2111/M2112/M2113/M2114/M2115/M2116/M2117/M2118/M2119/M2120/M2121/M2122/M2123/M2124/M2125/M2126/M2127/M2128/M2129/M2130/M2131/M2132/M2133/M2134/M2135/M2136/M2137/M2138/M2139/M2140/M2141/M2142/M2143/M2144/M2145/M2146/M2147/M2148/M2149/M2150/M2151/M2152/M2153/M2154/M2155/M2156/M2157/M2158/M2159/M2160/M2161/M2162/M2163/M2164/M2165/M2166/M2167/M2168/M2169/M2170/M2171/M2172/M2173/M2174/M2175/M2176/M2177/M2178/M2179/M2180/M2181/M2182/M2183/M2184/M2185/M2186/M2187/M2188/M2189/M2190/M2191/M2192/M2193/M2194/M2195/M2196/M2197/M2198/M2199/M2200/M2201/M2202/M2203/M2204/M2205/M2206/M2207/M2208/M2209/M2210/M2211/M2212/M2213/M2214/M2215/M2216/M2217/M2218/M2219/M2220/M2221/M2222/M2223/M2224/M2225/M2226/M2227/M2228/M2229/M2230/M2231/M2232/M2233/M2234/M2235/M2236/M2237/M2238/M2239/M2240/M2241/M2242/M2243/M2244/M2245/M2246/M2247/M2248/M2249/M2250/M2251/M2252/M2253/M2254/M2255/M2256/M2257/M2258/M2259/M2260/M2261/M2262/M2263/M2264/M2265/M2266/M2267/M2268/M2269/M2270/M2271/M2272/M2273/M2274/M2275/M2276/M2277/M2278/M2279/M2280/M2281/M2282/M2283/M2284/M2285/M2286/M2287/M2288/M2289/M2290/M2291/M2292/M2293/M2294/M2295/M2296/M2297/M2298/M2299/M2300/M2301/M2302/M2303/M2304/M2305/M2306/M2307/M2308/M2309/M2310/M2311/M2312/M2313/M2314/M2315/M2316/M2317/M2318/M2319/M2320/M2321/M2322/M2323/M2324/M2325/M2326/M2327/M2328/M2329/M2330/M2331/M2332/M2333/M2334/M2335/M2336/M2337/M2338/M2339/M2340/M2341/M2342/M2343/M2344/M2345/M2346/M2347/M2348/M2349/M2350/M2351/M2352/M2353/M2354/M2355/M2356/M2357/M2358/M2359/M2360/M2361/M2362/M2363/M2364/M2365/M2366/M2367/M2368/M2369/M2370/M2371/M2372/M2373/M2374/M2375/M2376/M2377/M2378/M2379/M2380/M2381/M2382/M2383/M2384/M2385/M2386/M2387/M2388/M2389/M2390/M2391/M2392/M2393/M2394/M2395/M2396/M2397/M2398/M2399/M2400/M2401/M2402/M2403/M2404/M2405/M2406/M2407/M2408/M2409/M2410/M2411/M2412/M2413/M2414/M2415/M2416/M2417/M2418/M2419/M2420/M2421/M2422/M2423/M2424/M2425/M2426/M2427/M2428/M2429/M2430/M2431/M2432/M2433/M2434/M2435/M2436/M2437/M2438/M2439/M2440/M2441/M2442/M2443/M2444/M2445/M2446/M2447/M2448/M2449/M2450/M2451/M2452/M2453/M2454/M2455/M2456/M2457/M2458/M2459/M2460/M2461/M2462/M2463/M2464/M2465/M2466/M2467/M2468/M2469/M2470/M2471/M2472/M2473/M2474/M2475/M2476/M2477/M2478/M2479/M2480/M2481/M2482/M2483/M2484/M2485/M2486/M2487/M2488/M2489/M2490/M2491/M2492/M2493/M2494/M2495/M2496/M2497/M2498/M2499/M2500/M2501/M2502/M2503/M2504/M2505/M2506/M2507/M2508/M2509/M2510/M2511/M2512/M2513/M2514/M2515/M2516/M2517/M2518/M2519/M2520/M2521/M2522/M2523/M2524/M2525/M2526/M2527/M2528/M2529/M2530/M2531/M2532/M2533/M2534/M2535/M25

9. Licht, J. D. Reconstructing a disease: What essential features of the retinoic acid receptor fusion oncoproteins generate acute promyelocytic leukemia? / J. D. Licht // *Cancer cell*. – 2006. – Vol. 9, №. 2. – P. 73–74
10. Meyer, C. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013 / C. Meyer, J. Hofmann, T. Burmeister, [et al.] // *Leukemia*. – 2013. – Vol. 27, №. 11. – P. 2165–2176.
11. Schnittger, S. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML / S. Schnittger, U. Kinkelin, C. Schoch, [et al.] // *Leukemia*. – 2000. – Vol. 14, №. 5. – P. 796–804.
12. Thiede, C. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis / C. Thiede, C. Steudel, B. Mohr, [et al.] // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2002. – Vol. 99, №. 12. – P. 4326–4335.
13. Falini, B. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias / B. Falini, I. Nicoletti, N. Bolli, [et al.] // *Haematologica*. – 2007. – Vol. 92, №. 4. – P. 519–532.
14. Grafone, T. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment / T. Grafone, M. Palmisano, C. Nicci, [et al.] // *Oncology reviews*. – 2012. – Vol. 6, №. 1. – P. 64–74
15. Rosnet, O. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells / O. Rosnet, H. J. Bühring, S. Marchetto, [et al.] // *Leukemia*. – 1996. – Vol. 10, №. 2. – P. 238–248.
16. Бавыкин, А. С. Flts-тирозинкиназа при острых нелимфобластных лейкозах / А. С. Бавыкин, М. А. Волкова // *Онкогематология*. – 2006. – №. 1. – С. 15–24.
17. Whitman, S. P. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study / S. P. Whitman, K.

J. Archer, L. Feng, [et al.] // Cancer research. – 2001. – Vol. 61, №. 19. – P. 7233–7239.

18. Schnittger, S. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease / S. Schnittger, C. Schoch, M. Dugas, [et al.] // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2002. – Vol. 100, №. 1. – P. 59–66.

19. Antar, A. Inhibition of FLT3 in AML: a focus on sorafenib / A. Antar, Z. K Otrock, J. El-Cheikh, [et al.] // Bone marrow transplantation. – 2017. – Vol. 52, №. 3. – P. 344–351.

20. Allen, C. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia / C. Allen, R. K. Hills, K. Lamb, [et al.] // Leukemia. – 2013. – Vol. 27, №. 9. – P. 1891–1901.

21. Cornelissen, J. J. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? / J. J. Cornelissen, W. L. J Van Putten, L. F Verdonck, [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 109, №. 9. – P. 3658–3666.

22. Kühnl, A. Molecular markers in acute myeloid leukaemia / A. Kühnl, D. Grimwade // International journal of hematology. – 2012. – Vol. 96, №. 2. – P. 153–163.

23. Grimwade, D. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials / D. Grimwade, R. K. Hills, A. V. Moorman, [et al.] // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – Vol. 116, №. 3. – P. 354–365.

24. Breems, D. A. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype / DA Breems, W. L. J Van

Putten, G. E De Greef, [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2008. – Vol. 26, №. 29. – P. 4791–4797.

25. Smith, M. L. Independent prognostic variables in acute myeloid leukaemia / M. L. Smith, R. K. Hills, D. Grimwade // Blood reviews. – 2011. – Vol. 25, №. 1. – P. 39–51.

26. Меликян, А. Л. Биология миелопролиферативных новообразований / А.Л. Меликян, И. Н. Суборцева // Клиническая онкогематология. – 2016. – Т. 9, №. 3. – С. 314–325

27. Naeim, F. Myeloproliferative Neoplasms Associated with JAK2, MPL, and CALR Mutations / F. Naeim, N. P. Rao, S. X. Song, [et al.] // Atlas of Hematopathology. –2018. – № 12. – P. 217–238.

28. Velazquez, L. A protein tyrosine kinase in the interferon  $\alpha\beta$  signaling pathway / L. Velazquez, M. Fellous, G. R. Stark, [et al.] // Cell. – 1992. – Vol. 70, №. 2. – P. 313–322.

29. Igaz, P. Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice / P. Igaz, S. Toth, A. Falus // Inflammation Research. – 2001. – Vol. 50, №. 9. – P. 435–441.

30. Hammaren, H. M. The regulation of JAKs in cytokine signaling and its breakdown in disease/H.M. Hammaren, A. T. Virtanen, J. Raivola, [et al.] // Cytokine. – 2019. – Vol. 118. – P. 48–63.

31. Morita, Y. Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced cell death in fibroblasts / Y. Morita, T. Naka, Y. Kawazoe, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2000. – Vol. 97, №. 10. – P. 5405–5410.

32. Абдулкадыров, К. М. Миелопролиферативные новообразования / К. М. Абдулкадыров, В. А. Шуваев, И. С. Мартынкевич // Литтерра. – 2016. – Т. 304. – С. 171.




33. Baxter, E. J. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders / E. J. Baxter, L. M. Scott, P. J. Campbell, [et al.] // *The Lancet*. – 2005. – Vol. 365, №. 9464. – P. 1054–1061.
34. Scott, L. M. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis / L. M. Scott, W. Tong, R. L. Levine, [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 356, №. 5. – P. 459–468.
35. Pikman, Y. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia / Y. Pikman, B. H. Lee, T. Mercher, [et al.] // *PLoS medicine*. – 2006. – Vol. 3, №. 7. – P. 1–12.
36. Ferreira Cristina, S. Somatic Mutations in Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms / S. Ferreira Cristina, B. Polo, J. F. Lacerda // *Seminars in Hematology*. – 2018. Vol. 55, № 4. – P. 215–222
37. Staerk, J. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective / J. Staerk, S. N. Constantinescu // *Jak-Stat*. – 2012. – Vol. 1, №. 3. – P. 184–190.
38. Skoda, R. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms / R. C. Skoda, A. Duek, J. Grisouard // *Experimental hematology*. – 2015. – Vol. 43, №. 8. – P. 599–608.
39. Абдулкадыров, К.М. Современные представления о диагностике и лечении эссенциальной тромбоцитемии / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, [и др.] // *Вестник гематологии*. – 2014. – Т.10, №1. – С. 4–39.
40. Lu, Y. C. Functional roles of calreticulin in cancer biology / Y. C. Lu, W. C. Weng, H. Lee // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–10.
41. Burns, K. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor / K. Burns, B. Duggan, E. A. Atkinson. // *Nature*. – 1994. – P. 476–480.
42. Krause, K. H. Calreticulin / K. H. Krause, M. Michalak // *Cell*. – 1997. – Vol. 88, №4. – P. 439–443.
43. Michalak, M. Calreticulin / M. Michalak, R. E. Milner, K. Burns, M. Opas // *Biochemical Journal*. – 1992. – № 3. – P. 681– 692.

44. Klampfl, T. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms / T. Klampfl, H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan // The new England journal of medicine. – 2013. – № 369. – P. 2379–2389.
45. Pardanani, A. D. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients / A. D. Pardanani, R. L. Levine, T. Lasho, [et al.] // Blood. – 2006. – Vol.108, №10. – P. 3472–3476.
46. Araki, M. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. / M. Araki, Y. Yang, N. Masubuchi, [et al.] // Blood. – 2016. – Vol.127, №10. – P. 1307–1316.
47. Kiyoi, H. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia / H. Kiyoi, T. Naoe, S. Yokota, [et al.] // Leukemia. – 1997. – Vol. 11, №. 9. – P. 1447–1452.
48. Kim, Y. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length / Y. Kim, G. D Lee, J. Park, [et al.] // Blood cancer journal. – 2015. – Vol. 5, №. 8. – P. 1–7.
49. Beretta, C. Development of a quantitative-PCR method for specific FLT3/ITD monitoring in acute myeloid leukemia / C. Beretta, G. Gaipa, V. Rossi, [et al.] // Leukemia. – 2004. – Vol. 18, №. 8. – P. 1441–1444.
50. Abdelhamid, E. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia / E. Abdelhamid, C. Preudhomme, N. Helevaut, [et al.] // Leukemia research. – 2012. – Vol. 36, №. 3. – P. 316–323.
51. Kamps, R. Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification / R. Kamps, R. D. Brandão, B. J. Bosch, [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol. 18, №. 2. – P. 1–57.
52. Jones, A. V. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms / A. V. Jones, D. Ward, M. Lyon, [et al.] // Leukemia research. – 2015. – Vol. 39, №. 1. – P. 82–87.

53. Mehrotra, M. Clinical validation of a multipurpose assay for detection and genotyping of CALR mutations in myeloproliferative neoplasms / M. Mehrotra, R. Luthra, R. R. Singh, [et al.] // American journal of clinical pathology. – 2015. – Vol. 144, №. 5. – P. 746–755.
54. Maier, C. L. Development and validation of CALR mutation testing for clinical diagnosis / C. L. Maier, K. E. Fisher, H. H. Jones, [et al.] // American journal of clinical pathology. – 2015. – Vol. 144, №. 5. – P. 738–745.
55. Bilbao-Sieyro, C. High resolution melting analysis: a rapid and accurate method to detect CALR mutations / C. Bilbao-Sieyro, G. Santana, M. Moreno, [et al.] // PloS one. – 2014. – Vol. 9, №. 7. – P. 1–5.
56. Chi, J. Calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms and new methodology for their detection and monitoring / J. Chi, M. Manoloukos, C. Pierides, [et al.] // Annals of hematology. – 2015. – Vol. 94, №. 3. – P. 399–408.
57. Luo, W. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs) / W. Luo, Z. Yu // Stem cell investigation. – 2015. – Vol. 2. – P. 1–10
58. White, H. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of Rotor- Gene 6000 (Corbett Life Science), HR-1 and 384 well Light Scanner (Idaho technology) / H. White, G. Potts // National Genetics Reference Laboratory. – 2013. – P.1–45.
59. Wittwer, C. High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. / G. Reed, C. Gundry, J. Vandersteen, [et al.] // Clinical chemistry – 2003. – P. 853–860.
60. Rozovski, U. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2, CALR, and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis / U. Rozovski, S. Verstovsek, T. Manshouri, [et al.] // Haematologica. – 2017. – Vol. 102, № 1. – P. 79–84.
61. Tan, A. Y. C. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3–internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia / A. Y. C. Tan, D. A Westerman, D. A Carney, [et al.] // Journal of hematology & oncology. – 2008. – Vol. 1, №. 1. – P. 1–10.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой

 Шишацкая Е.И.  
подпись                      инициалы, фамилия  
« 3 »                      июля                      2020 г.


**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология  
код – наименование направления

Использование метода HRM для анализа соматических мутаций при  
гемобластозах

тема

Руководитель

  
подпись, дата

доцент, канд. биол. наук  
должность, ученая степень

Т.Н. Субботина

Выпускник

  
подпись, дата

Д.В. Курочкин

Красноярск 2020